

OBTENCIÓN, MADURACIÓN *IN VITRO* DE LA AFINIDAD Y MAPEO EPITÓPICO FUNCIONAL DE UN FRAGMENTO RECOMBINANTE DE ANTICUERPO HUMANO TIPO SCFV QUE BLOQUEA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

Autores principales: Humberto Lamdan Ordas y Jorge Víctor Gavilondo Cowley

Otros autores: Gertrudis Rojas, Yasmiana Muñoz, Marta Ayala, Alexis Mussachio, Lincidio Pérez, Vivian Huerta, Amaury Pupo y Yanelys Morera

Colaboradores: Robert F. Balint, Jeng Her, James W. Larrick, Osmany Guirola, Glay Chinaea, Sonia González y Boris Acevedo

Entidad ejecutora principal: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa PO Box 6162, La Habana 10600, Cuba.

Autor para la correspondencia: (aporte semejante):
humberto.lamdan@cigb.edu.cu, jorge.gavilondo@cigb.edu.cu.
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba,
2716022 ext. 7120

Humberto Lamdan (33%). Realizó las selecciones originales de la biblioteca de scFv humanos del CIGB. Caracterizó bioquímica y biológicamente los scFv 2H1 y L3H6. Preparó las bibliotecas de fagos de las regiones VH y VL mutadas a partir de material preparado por el otro autor. Realizó las selecciones de fragmentos a partir de estas. Diseñó y preparó las bibliotecas de mutantes de VEGF en fagos a partir de material preparado por el otro autor. Participó en las discusiones de resultados. Es coautor principal de las dos patentes presentadas y primer autor de los dos artículos.

Jorge V. Gavilondo (33%). Fue gestor de la idea de desarrollar fragmentos de anticuerpos bloqueadores de VEGF. Coordinó el trabajo y garantizó el apoyo administrativo y financiero para las investigaciones. Diseñó y construyó el ADN para las bibliotecas de regiones VH y VL mutadas. Diseñó y construyó el ADN para las bibliotecas de VEGF mutado con vistas al estudio epitópico. Participó en las discusiones de resultados. Es co-autor principal de las dos patentes presentadas y de los dos artículos.

Gertrudis Rojas (10%). Participó en el diseño de las variantes mutadas del VEGF para la definición del epitopo funcional reconocido por el fragmento de anticuerpo L3H6. Fue asesora del primer autor en las primeras selecciones realizadas a partir de la biblioteca de scFv humanos del CIGB. Participó en las discusiones de resultados.

Yasmiana Muñoz (9%). Trabajó apoyando las selecciones de fragmentos y de mutantes de VEGF. Preparó antígenos para selecciones y caracterizaciones de los fragmentos. Trabajó en las metodologías de purificación del L3H6 a partir de sobrenadante bacteriano y en su caracterización bioquímica. Participó en discusiones de resultados.

Marta Ayala (5%). Garantizó el apoyo administrativo y financiero para las investigaciones. Participó en las discusiones de resultados.

Alexis Mussachio (2%). Trabajó en las metodologías de purificación del L3H6 a partir de sobrenadante bacteriano y en su caracterización bioquímica. Participó en discusiones de resultados.

Lincidio Pérez (2%). Realizó el clonaje del fragmento de anticuerpo L3H6 en un vector para su expresión como molécula soluble.

Vivian Huerta (2%). Apoyó en los experimentos de determinación de afinidad de los fragmentos mediante BIACore.

Amaury Pupo (2%). Participó en el diseño de las variantes mutadas del VEGF para la definición del epítipo funcional reconocido por el fragmento de anticuerpo L3H6.

Yanelys Morera (2%). Apoyó con los antígenos utilizados en las selecciones y caracterizaciones.

RESUMEN

Antecedentes: El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF-A) es el promotor principal de la neoangiogénesis sanguínea, proceso vital para el desarrollo y funcionamiento normal del organismo, pero también asociado a un amplio grupo de enfermedades que incluyen desde el cáncer hasta la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). El desarrollo de medicamentos anti-angiogénicos dirigidos a bloquear el VEGF-A ha devenido en una gran plataforma farmacéutica, ya con una decena de moléculas terapéuticas aprobadas, entre ellas los anticuerpos recombinantes Bevacizumab (Avastin®; cáncer) y Ranibizumab (Lucentis®; DMAE). Los anticuerpos recombinantes, por su gran especificidad, versatilidad estructural y bajo perfil tóxico constituyen la categoría de productos biotecnológicos terapéuticos de mayor desarrollo actual.

Problema a resolver y Objetivos del trabajo: En Cuba no están disponibles un anticuerpo ni fragmento de este que bloqueen el VEGF-A, y que puedan ser empleados para el tratamiento de la DMAE el cáncer. Nuestro principal objetivo fue entonces la obtención de un fragmento de anticuerpo recombinante capaz de bloquear del efecto pro-angiogénico del VEGF-A. El fragmento debía tener una afinidad suficiente para subsiguiente desarrollo farmacéutico, y reconocer un

epítope en el VEGF-A diferente de los identificados por otros anticuerpos publicados, con vistas a su protección intelectual.

Resultados: Partiendo de una biblioteca de fragmentos de anticuerpos humanos tipo scFv desplegada en fagos filamentosos obtenida en el CIGB (premio de la ACC en 2004), y empleando una novedosa estrategia de selección por perturbación de epítopes en el VEGF-A, se obtuvo un fragmento de anticuerpo recombinante tipo scFv que bloquea al VEGF-A humano. El fragmento se sometió entonces a un proceso de maduración de la afinidad *in vitro* mediante mutagénesis de CDR3, construcción de sub-bibliotecas y mezcla de las regiones VH y VL con mejor reconocimiento del antígeno. El fragmento scFv resultante, denominado L3H6 tiene una afinidad 18 veces mayor que el parental y reduce en 14 veces la IC50 necesaria para la neutralización. Se realizó la identificación funcional del epitopo reconocido por este en el VEGF-A mediante bibliotecas de mutaciones del antígeno. Se determinó que L3H6 reconoce un epitopo nuevo, diferente a los identificados por otros anticuerpos anti-VEGF. El fragmento scFv L3H6 tiene propiedades potenciales para su aplicación en el tratamiento de la DMAE y el cáncer. A tales efectos, se transfirió al Depto. de Desarrollo del CIGB, que trabaja en su escalado y formulación.

Este trabajo se describe exactamente en dos publicaciones en revistas internacionales (FI de 3 y 3.5), que se anexan a este trabajo. Hay dos patentes aplicadas que cubren estos resultados. Se adjunta el aval de transferencia a Desarrollo, además de los correspondientes a la Dirección del CIGB, los Consejos Científicos del CIGB y el CIM, y de los directores de instituciones científicas extranjeras colaboradoras.

Conclusiones: A través de técnicas de ingeniería genética avanzadas, se desarrolló un novedoso fragmento de anticuerpo recombinante tipo scFv que bloquea el efecto pro-angiogénico del VEGF-A. El fragmento tiene el potencial para su ulterior desarrollo en forma de un medicamento de aplicación al tratamiento de la DMAE y el cáncer. En Cuba no están disponibles un anticuerpo ni fragmento de este, que puedan ser empleados en estas enfermedades.

COMUNICACIÓN CORTA

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF-A) es el promotor principal de la neo-angiogénesis sanguínea, proceso vital para el desarrollo y funcionamiento normal del organismo, pero también asociado a un amplio grupo de enfermedades que incluyen desde el cáncer hasta la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). El desarrollo de medicamentos anti-angiogénicos dirigidos a bloquear el VEGF-A ha devenido en una gran plataforma farmacéutica, ya con una decena de moléculas terapéuticas aprobadas, entre ellas los anticuerpos recombinantes Bevacizumab (Avastin®; cáncer) y Ranibizumab (Lucentis®; DMAE). Los anticuerpos recombinantes, por su gran especificidad, versatilidad estructural y bajo perfil tóxico constituyen la categoría de productos biotecnológicos terapéuticos de mayor desarrollo actual.

En Cuba no están disponibles un anticuerpo ni fragmento de este que bloqueen el VEGF-A, y que puedan ser empleados para el tratamiento de la DMAE y el cáncer. Nuestro principal objetivo fue la obtención de un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFv) recombinante, capaz de bloquear el efecto pro-angiogénico del VEGF-A. El fragmento de anticuerpo debía tener una afinidad suficiente para su subsiguiente desarrollo farmacéutico, y reconocer un epitopo en el VEGF-A diferente de los identificados por otros anticuerpos publicados, con vistas a su protección intelectual.

Con este objetivo diseñamos una estrategia basada en el uso de una variante mutada del VEGF-A como antígeno blanco para la selección de fragmentos de anticuerpo sobre fagos, a partir de una biblioteca de scFv humanos (1). Esta variante, denominada p64k-hVEGF_{KDR}⁻, contiene tres cambios de aminoácidos en una región de la molécula involucrada en la interacción con el Bevacizumab. Después de demostrar que en efecto el Bevacizumab no reconoce a p64k-hVEGF_{KDR}⁻, se realizó el procedimiento de selección sobre este antígeno inmovilizado a una fase sólida. Como resultado de esta estrategia novedosa, que denominamos perturbación epitópica, se obtuvo un panel de siete scFv sobre fagos con diferentes secuencias y distintos patrones de reconocimiento contra diferentes variantes de VEGF-A. Se demostró que los siete fragmentos de anticuerpo además de reconocer al antígeno mutado utilizado en la selección, reconocen la forma nativa del VEGF-A humano, biológicamente activa. Los resultados obtenidos en este experimento indicaron que no se obtuvieron sitios de unión contra epitopos artificiales que pudieron haberse creado en esta proteína de fusión que contiene la variante mutada del VEGF-A humano y se usó como base para la selección. Por lo tanto el panel de fragmentos de anticuerpo sobre fagos que se seleccionó cumplió con el primer requisito necesario para la búsqueda de scFv neutralizantes: el reconocimiento de epitopos presentes en la molécula de VEGF-A nativa. Para la búsqueda de scFv potencialmente neutralizantes dentro del panel, se realizó un ensayo de competencia por la unión al VEGF-A entre una variante soluble del receptor de VEGF-A (KDR-Fc) y los scFvs sobre fagos. La unión del scFv denominado 2H1 al VEGF-A fue inhibida en más de un 50% por el KDR soluble. Este resultado demostró que el 2H1 sobre fagos compite con el KDR por la unión al VEGF-A.

Se seleccionó el 2H1 para una caracterización adicional para confirmar su actividad neutralizante. Este scFv se produjo como molécula soluble (fuera del contexto del fago) en *E. coli* y se purificó del sobrenadante de cultivo de las bacterias recombinantes. El 2H1 purificado reconoció al VEGF-A nativo de manera dosisdependiente y bloqueó la unión de este ligando a su receptor KDR. Posteriormente se demostró su capacidad neutralizante en un ensayo *in vitro* con células endoteliales humanas aisladas de la vena del cordón umbilical que dependen del VEGF-A para proliferar. Con este ensayo se demostró que el 2H1 es capaz de neutralizar la actividad biológica del VEGF-A humano. Al caracterizar su afinidad determinamos que el mismo posee una afinidad moderada por el

VEGF lo cual condujo al diseño y posterior ejecución de una estrategia para su incremento.

Se construyeron dos bibliotecas independientes sobre fagos a partir de la diversificación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de los dominios de cadena pesada (VH) y ligeras (VL) del 2H1, mediante mutagénesis parsimoniosa (2). Con estas dos bibliotecas por separado se realizó un procedimiento de selección contra VEGF-A humano en presencia del scFv 2H1 soluble para favorecer el aislamiento de fragmentos de anticuerpo de mayor afinidad. Mediante esta estrategia se obtuvieron diferentes variantes mutadas con mayor afinidad por el VEGF-A que el 2H1. El análisis de las secuencias de las nuevas variantes de mayor afinidad seleccionadas de la biblioteca de regiones VL mutadas reveló la presencia de aminoácidos conservados en determinadas posiciones, al igual que la secuencia parental y la aparición de mutaciones recurrentes en otras posiciones. Las mutaciones recurrentes de las variantes seleccionadas indicaron que estas sustituciones probablemente contribuyeron al incremento de la afinidad. De este análisis surgió la hipótesis de que mediante la combinación de las mutaciones recurrentes encontradas con los aminoácidos conservados en una misma molécula era posible incrementar aún más la afinidad de unión al VEGF-A humano. La nueva variante obtenida (L3) mostró mayor afinidad. Finalmente decidimos combinar las tres regiones VH que produjeron los mayores incrementos en la capacidad de unión del VEGF con el dominio VL de la variante optimizada L3, para buscar un incremento mayor en la afinidad. Entre todas las nuevas variantes, L3H6 mostró la mayor afinidad de interacción con el VEGF-A humano, con un incremento de 18 veces respecto al scFv parental según se determinó mediante BIAcore. Este aumento se correspondió con un incremento en la capacidad para bloquear la interacción del VEGF-A con el KDR (Figura 1).

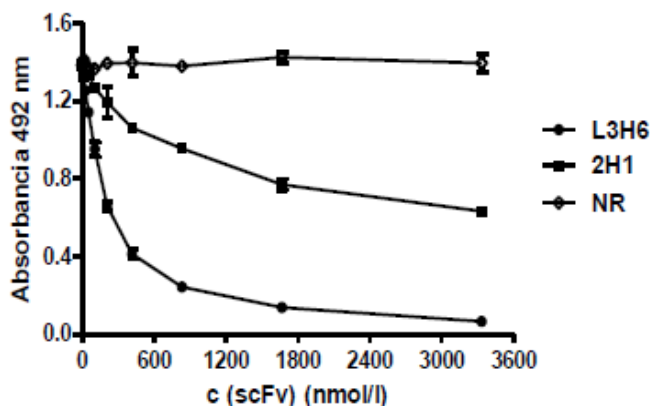


Figura 1. Inhibición de la unión del VEGF al KDR por los fragmentos de anticuerpos anti-VEGF. Se preincubaron diferentes concentraciones de los scFvs purificados L3H6, 2H1 o un scFv no relacionado (NR) con una concentración fija de VEGF121 (50 ng/ml) y se transfirieron después a placas de microtitulación recubiertas con KDR-Fc. Las moléculas de VEGF que se unieron al KDR se detectaron con anticuerpos policlonales anti-VEGF conjugados a peroxidasa.

Para definir molecularmente el epítopo funcional reconocido por el fragmento de anticuerpo L3H6 diseñamos una estrategia de mutagénesis dirigida sobre el VEGF-A humano expuesto sobre fagos filamentosos. Basado en la baja reactividad cruzada del scFv L3H6 contra el VEGF de ratón sobre fagos, cada residuo expuesto al solvente (>20%) que difieren entre el VEGF de ratón y el humano se reemplazó de manera individual en este último por el aminoácido que aparece en la posición equivalente en el VEGF de ratón. De esta forma la pérdida de reconocimiento de alguna de estas variantes por el scFv L3H6 es indicativa de la participación de ese aminoácido que se sustituyó en la formación del epítopo reconocido por este nuevo fragmento de anticuerpo neutralizante. Se definieron primeramente tres aminoácidos en el VEGFA humano (E72, N100 y K101) esenciales para el reconocimiento por L3H6. Posteriormente se completó la caracterización del epítopo funcional mediante nuevas variantes mutadas del VEGF-A humano en las que se sustituyeron individualmente por alanina los aminoácidos de la vecindad de K101. La integración de los resultados obtenidos con el panel completo de variantes mutadas permitió definir el epítopo funcional reconocido por el fragmento de anticuerpo L3H6 en el VEGF-A humano, el cual está formado por los aminoácidos Y25, T71, E72, N100, K101, E103 y R105. Aunque estos residuos no están contiguos en la secuencia primaria, forman un grupo muy bien delimitado en la estructura terciaria de la proteína con una extensa área expuesta al solvente (Figura 2) y definen así un nuevo epítopo conformacional neutralizante en el VEGF-A humano.

El reconocimiento de las variantes mutadas de VEGF por el Bevacizumab y por anticuerpos policlonales anti-VEGF, permitió descartar defectos de plegamiento en aquellas moléculas donde las sustituciones provocaron afectaciones en el reconocimiento por el scFv L3H6. El hecho de que la sustitución G88S en una de las variantes producidas causó una afectación total en el reconocimiento por el Bevacizumab, según se ha reportado (3), sin afectar la unión al scFv L3H6, validó la exactitud de nuestro método de mapeo con un epítopo bien estudiado como modelo. A su vez, estos resultados demostraron claramente que el scFv L3H6 reconoce un epítopo diferente al reconocido por el Bevacizumab.

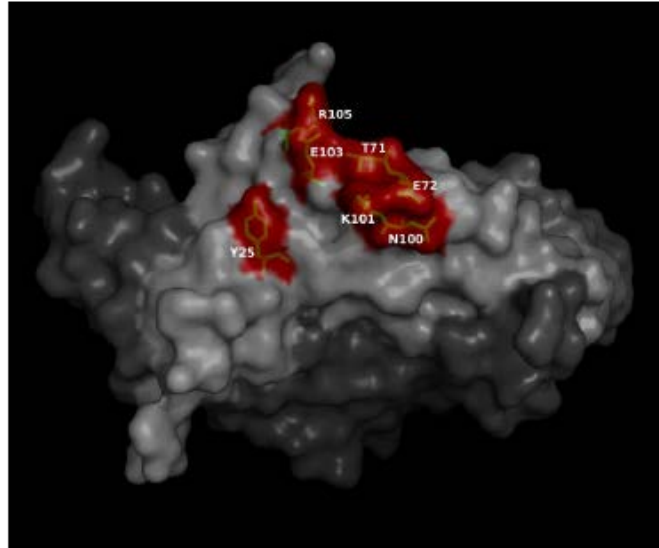


Figura 2. Epitopo reconocido por el scFv L3H6 en el VEGF-A humano. Se muestra una representación de superficie del homodímero del VEGF-A humano (PDB, código de acceso 1FLT). En color gris oscuro se representa uno de los dos monómeros y en gris claro el otro monómero. Los residuos que forman el epitopo reconocido por el fragmento de anticuerpo L3H6 en el VEGF-A humano aparecen enumerados según su posición en la secuencia de la proteína.

Para confirmar el epitopo funcional definido para el L3H6 utilizamos una estrategia complementaria basada en la ganancia de reconocimiento. Los residuos del VEGF-A humano que se identificaron previamente como importantes para la formación del epitopo y que son diferentes con respecto al VEGF de ratón se reemplazaron en las posiciones equivalentes de este último. La introducción simultánea de las mutaciones S72E, S100N y R101K resultó en el reconocimiento de esta variante por el scFv L3H6. Estos resultados confirmaron inequívocamente la identidad del epitopo conformacional reconocido por el scFv L3H6. Por otra parte, la introducción de la sustitución S88G en el VEGF de ratón fue suficiente para reconstruir el epitopo reconocido por el Bevacizumab, lo cual validó el método utilizado para la reconstrucción del epitopo.

El impacto científico-técnico y social de este trabajo es que ha dado lugar a la obtención de un nuevo fragmento de anticuerpo neutralizante del VEGF-A humano (L3H6) que constituye un candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el aumento de la angiogénesis, tales como el cáncer y la DMAE. La especificidad de este anticuerpo por un epitopo neutralizante diferente a los reportados previamente, lo convierte en una herramienta útil para ampliar la caracterización de la interacción del VEGFA con su receptor KDR en condiciones de angiogénesis patológica. Por otra parte, la metodología descrita en este trabajo para obtener anticuerpos contra nuevos epitopos en el VEGF pudiera servir de base para el diseño de nuevas estrategias dirigidas a la selección de fragmentos de anticuerpo sobre fagos hacia una especificidad deseada en otros sistemas antigénicos.

Referencias citadas:

1. G. Rojas, H. Lamdan, S. Padron, Y. Munoz, M. Ayala and J. V. Gavilondo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 336, 1207-1213.
2. R. F. Balint and J. W. Larrick, *Gene*, 1993, 137, 109-118.
3. Y. A. Muller, Y. Chen, H. W. Christinger, B. Li, B. C. Cunningham, H. B. Lowman and A. M. de Vos, *Structure*, 1998, 6, 1153-1167.